

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001732

International filing date: 31 January 2005 (31.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-026689
Filing date: 03 February 2004 (03.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 17 March 2005 (17.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE 31.1.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 2月 3日

出願番号
Application Number: 特願2004-026689

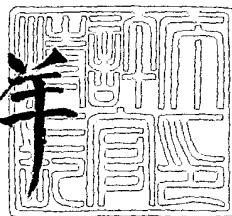
[ST. 10/C]: [JP2004-026689]

出願人
Applicant(s): 学校法人 久留米大学

2005年 3月 4日

特許長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 P103K17196
【提出日】 平成16年 2月 3日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
【住所又は居所】 福岡県久留米市日吉町1番地1 アーバンパレス久留米センターステージ302
【氏名】 井上 浩義
【特許出願人】
【識別番号】 599045903
【氏名又は名称】 学校法人久留米大学
【代理人】
【識別番号】 100104673
【弁理士】
【氏名又は名称】 南條 博道
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 050740
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【物件名】 委任状 1
【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

電気透析装置を用いて、陽イオン性タンパク質を分離精製する方法であって、該電気透析装置が、陽極と陰極と有する電気透析槽を備え、そして該電気透析槽が、該陽極側から順に、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室を備え、該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、そして該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られており、そして該方法が、
(1) 該原料投入室に陽イオン性タンパク質含有水性溶液を投入し、該陽極室、該濃縮室、および該陰極室に電解質溶液を投入する工程、
(2) 該電気透析装置に電流を負荷する工程、および
(3) 該濃縮室から陽イオン性タンパク質を含有する溶液を回収する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

前記陽イオン性タンパク質が、ラクトフェリンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記電流の電流密度が $0.1 \sim 50 \text{ mA/cm}^2$ である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記(1)の工程において、前記原料投入室にさらに陰イオン交換体またはキレート化剤が添加される、請求項 1 ~ 3 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 5】

前記陽イオン交換膜の原料投入室側の面が、陰イオン交換膜で被膜されている、請求項 1 ~ 4 のいずれかの項に記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】陽イオン性タンパク質の分離精製方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、陽イオン性タンパク質、特にラクトフェリンの分離精製方法に関する。 【背景技術】

【0002】

ラクトフェリンは、1分子中に2個の鉄を結合している、分子量約80,000の鉄結合性の糖タンパク質である。ラクトフェリンは、多くの哺乳動物の体液中、例えば、乳汁中に存在する。特に、母乳の初乳には、5~10g/L含まれ、含有されている全タンパク質の30%~70%を占めることが知られている。ラクトフェリンは、乳児の健康維持および発育に重要なタンパク質であると共に、近年、抗菌作用および抗バクテリア作用を有することが明らかになり、食品工業の他、様々な分野で利用されている。

【0003】

ラクトフェリンは、一般に、初乳、常乳、チーズホエイ（チーズ製造時に生じる残渣）などから抽出されている（例えば、非特許文献1および2）。pHが約6であるチーズホエイ中では、ラクトフェリンは陽イオン性であるのに対して、他のタンパク質の大部分は陰イオン性であるため、この性質が抽出に利用されている。例えば、非特許文献1には、ホエイと陽イオン交換樹脂とを接触させて陽イオン交換樹脂にラクトフェリンを吸着させ、この樹脂を高濃度塩類溶液で洗浄してラクトフェリンを脱離させ、次いでこのラクトフェリンを含む脱離液を限外濾過により脱塩して、ラクトフェリン濃縮物を得ることが記載されている。しかし、この方法では、工程が多く効率的ではない。さらにイオン交換樹脂の再生などの作業も煩雑である。

【0004】

その他にも、種々のラクトフェリンの分離精製方法が検討されている。例えば、非特許文献3には、陽イオン交換性セルロース膜を用いた単純拡散方法によって、チーズホエイからラクトフェリンを分離する方法が記載されている。しかし、この方法は、分離に時間がかかり効率的でない。また、電気泳動による分離方法（非特許文献4）、アフィニティクロマトグラフによる分離方法（非特許文献5）、キャピラリー電気泳動による分離方法（非特許文献6）なども検討されている。しかし、これらの方法はいずれも、研究室レベルの少量のラクトフェリンの分離精製方法であり、未だ実用化されていない。

【非特許文献1】富田守、MRC News 21、1998年、247頁

【非特許文献2】富田守、Foods Food Ingredients J. Jpn、181巻、1999年、33-41頁

【非特許文献3】Clovis K. ChiuおよびMark R. Etzel、Journal of Food Science、62巻、5号、1997年、996-1001頁

【非特許文献4】Hurley WLら、J Dairy Sci、76巻、1993年、377頁

【非特許文献5】M. K. WalshおよびS. H. Nam、Prep. Biochem. Biotechnol.、31巻、3号、2001年、229-240頁

【非特許文献6】Peter Riechelら、Journal of Chromatography A、817巻、1998年、187-193頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、ラクトフェリンのような陽イオン性タンパク質を変性させることなく、簡便に分離精製する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、電気透析装置を用いて、陽イオン性タンパク質を分離精製する方法を提供し、該電気透析装置は、陽極と陰極とを有する電気透析槽を備え、そして該電気透析槽が、

該陽極側から順に、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室を備え、該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、そして該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られており、そして該方法は、(1) 該原料投入室に陽イオン性タンパク質含有水性溶液を投入し、該陽極室、該濃縮室、および該陰極室に電解質溶液を投入する工程、(2) 該電気透析装置に電流を負荷する工程、および(3) 該濃縮室から陽イオン性タンパク質を含有する溶液を回収する工程を包含する。

【0007】

好ましい実施態様においては、上記陽イオン性タンパク質は、ラクトフェリンである。

【0008】

好ましい実施態様においては、上記電流の電流密度は $0.1 \sim 50 \text{ mA/cm}^2$ である。

【0009】

好ましい実施態様においては、上記(1)の工程において、前記原料投入室にさらに陰イオン交換体またはキレート化剤が添加される。

【0010】

好ましい実施態様においては、上記陽イオン交換膜の原料投入室側の面が、陰イオン交換膜で被膜されている。

【発明の効果】

【0011】

本発明の方法によれば、陽イオン性タンパク質、特にラクトフェリンを、変性させることなく、電気透析を行う工程のみで簡便に分離精製することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

(本発明の陽イオン性タンパク質の分離精製方法の原理)

本発明の陽イオン性タンパク質の分離精製方法は、特定の電気透析装置を用いて行われる。この電気透析装置は、例えば、図1に示すような電気透析槽を備え、該電気透析槽が、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室を備え、該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜(以下、陰イオン交換膜という場合がある)で仕切られ、該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜(以下、陽イオン交換膜という場合がある)で仕切られ、そして該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られている。本発明の方法では、この電気透析装置の原料投入室に、陽イオン性タンパク質含有水性溶液を投入し、そして陽極室、濃縮室、および陰極室に電解質溶液を投入した後、電極間に電流を負荷する。これによって、原料投入室中の陽イオン性タンパク質および陽イオン(金属イオン)は、陽イオン交換膜を透過して濃縮室に移行し、一方、陰イオン性タンパク質および陰イオンは、陰イオン交換膜を透過して陽極室に移行する。さらに、濃縮室に移行した陽イオン性タンパク質と陽イオンのうち、陽イオンおよび分子サイズが小さい陽イオン性タンパク質のみが微細孔膜を透過して陰極室に移行する。このとき、目的の陽イオン性タンパク質は分子サイズが大きいため、微細孔膜を透過できない。その結果、目的の陽イオン性タンパク質は、濃縮室中に濃縮される。

【0013】

(陽イオン性タンパク質含有水性溶液)

本発明の方法によって分離精製可能な陽イオン性タンパク質は、所定のpHの水性溶液中において陽イオン性を呈するタンパク質である。本発明においては、高い等電点を有する陽イオン性タンパク質が好ましい。例えば、pHが7において陽イオン性を呈するタンパク質としては、ラクトフェリン、ラクトペルオキシダーゼ、ピルビン酸キナーゼ、アルドラーゼ、ヘモグロビン、3-ホスホグリセリン酸、ホスホキナーゼ、キモトリプシンA、トリプシノーゲン、ミオグロビン、リソチーム、シトクロムなどが挙げられる。好ましくは、ラクトフェリンである。

【0014】

本発明に用いられる陽イオン性タンパク質含有水性溶液は、上記の陽イオン性タンパク質が含有されていれば、特に限定されない。例えば、ラクトフェリンを含有する水性溶液としては、乳汁（例えば、牛乳）などの哺乳動物の分泌液；脱脂乳、ホエイなどの乳汁加工物；微生物（ラクトフェリン遺伝子組換え菌を含む）または細胞の培養液または細胞破碎上清などが挙げられる。ラクトフェリンを大量に含有し、かつ容易に入手可能な点で、牛乳およびホエイが好適であり、廃棄物利用の点から、ホエイがより好適である。

【0015】

上記陽イオン性タンパク質含有水性溶液のpHは、分離精製する陽イオン性タンパク質が陽イオン性を呈するように、該タンパク質の等電点以下となるように適宜調節され得る。例えば、ラクトフェリンを分離精製する場合、該水性溶液のpHは、通常、7.5以下、好ましくは2～7.5、より好ましくは5～7である。例えば、ホエイはpHが約6であるため、pHの調節を必要としない点で好適である。pHの調節は、例えば、水酸化ナトリウム水溶液、希塩酸、リン酸、酢酸、コハク酸、クエン酸などの当業者が通常用いるpH調整剤を添加することによって行われる。

【0016】

上記陽イオン性タンパク質含有水溶液の塩濃度は、該水溶液の種類によって異なるが、通常、該溶液中に、灰分として好ましくは0.01質量%～5質量%、より好ましくは0.01質量%～1質量%である。例えば、新鮮なホエイの場合、灰分が0.4質量%～0.5質量%含有され、その中で、ナトリウムが0.03～0.05質量%、カリウムが0.12～0.16質量%、マグネシウムが0.02～0.03質量%、およびリンが0.03～0.05質量%含有され得る。生乳の場合、灰分が約0.7質量%含有され、その中で、ナトリウムが約0.05質量%、カリウムが約0.15質量%、マグネシウムが約0.01質量%、およびリンが約0.09質量%含有され得る。陽イオン性タンパク質が陽イオン性交換膜を透過する点から、塩濃度は低いことが好ましい。

【0017】

陽イオン性タンパク質含有水性溶液中の陽イオン性タンパク質濃度は特に限定されない。例えば、ホエイは、通常、ラクトフェリンを約100mg/L含む。

【0018】

（電気透析装置）

本発明の方法に用いられる電気透析装置は、陽極と陰極とを有する電気透析槽を備え、該電気透析槽が、該陽極側から順に、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室を備え、該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜（陰イオン交換膜）で仕切られ、該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜（陽イオン交換膜）で仕切られ、そして該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られている。

【0019】

陰イオン交換基を導入した多孔性膜（陰イオン交換膜）は、陰イオン交換基が導入され、陰イオンを選択的に透過する機能を有する多孔性膜であり、導入される陰イオン交換基の種類は特に限定されない。例えば、アンモニウム基、スルホニウム基、ホスホニウム基などが導入された強塩基性陰イオン交換膜、第1級アミノ基～第3級アミノ基が導入された弱塩基性陰イオン交換膜などが挙げられる。このような陰イオン交換膜は、多数市販されており、容易に入手可能である。

【0020】

陰イオン交換膜の孔径は、特に限定されないが、含有される主な陰イオン性タンパク質が透過できるように、その大きさに応じて適宜設定すればよい。通常、0.1nm～1nmである。

【0021】

陽イオン交換基を導入した多孔性膜（陽イオン交換膜）は、陽イオン交換基が導入され、陽イオンを選択的に透過する機能を有する多孔性膜であり、導入される陽イオン交換基の種類は特に限定されない。例えば、スルホン酸基、ホスホン酸基、硫酸エステル基、リン酸エ斯特ル基などの陽イオン交換基を有する強酸性陽イオン交換膜、カルボン酸基、フ

エノール性水酸基などの陽イオン交換基を有する弱酸性陽イオン交換膜などが挙げられる。さらに、膜の種類についても特に制限されず、例えば、濾紙膜、石油系高分子膜（ポリビニルアルコール膜）などを使用することができる。

【0022】

陽イオン交換膜の孔径は、目的の陽イオン性タンパク質の大きさ、および膜の種類に応じて適宜設定すればよい。例えば、陽イオン性タンパク質がラクトフェリンである場合、通常、孔径は、約 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ ～ $50\text{ }\mu\text{m}$ である。特に、陽イオン交換膜として濾紙膜を使用する場合は、約 $1\text{ }\mu\text{m}$ ～約 $5\text{ }\mu\text{m}$ が好ましい。陽イオン交換膜の厚みおよび交換容量についても特に制限はない。厚みは、通常、 $20\text{ }\mu\text{m}$ ～ 2 mm 程度である。交換容量は、例えば、濾紙膜の場合、 0.1 meq/g 乾燥膜～ 0.5 meq/g 乾燥膜程度、石油系高分子膜の場合、 0.1 meq/g 乾燥膜～ 4 meq/g 乾燥膜程度が好ましい。ポリビニルアルコール膜の場合は含水量が多いため、湿润膜当たりで交換容量が示され得、好ましくは 0.5 meq/g 湿润膜～ 2.0 meq/g 湿润膜程度である。

【0023】

陽イオン交換膜は、多数報告されており、容易に入手可能である、あるいは、紙漉き法（湿式法）およびキャスト法などによっても得られる。導入される交換基が多い点でキャスト法で得られる陽イオン交換膜が好ましく、耐久性が高い点では、紙漉き法によって得られる陽イオン交換膜が好ましい。

【0024】

紙漉き法は、例えば、陽イオン交換基を導入した膜素材を水中に分散させ、この膜素材を保持体上に漉くことによって行われる。

【0025】

膜素材としては、高純度高結晶セルロース（固体構造が多結晶セルロースⅠ～Ⅴのいずれでもよい）などのセルロース、キチン、キトサンなどが挙げられる。さらにセルロースが束になった漂白化学パルプ（長纖維パルプ）、綿リンターパルプなども用いられ得る。好ましくはセルロースおよび長纖維パルプである。

【0026】

保持体は、一般に、 $50\sim400$ メッシュ程度の網目状のものが用いられ、例えば、有機纖維、無機纖維、および金属纖維いずれも用いることができる。

【0027】

有機纖維としては、レーヨン、キュプラ、アセテート、ビニロン、ナイロン、ビニリデン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、アクリル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリクラールなどが挙げられる。好ましくはナイロンが用いられる。無機纖維としては、ガラス纖維、石英纖維、シリカ・アルミナ纖維、ロックウール、リン酸カルシウム纖維、チラノン纖維、シリカ纖維、炭化ケイ素纖維、アルミナ纖維、ジルコニア纖維、活性炭素纖維、炭素纖維、気相法炭素纖維、炭化ケイ素ウイスカ、窒化ケイ素ウイスカ、アルミナウイスカ、グラファイトウイスカ、チタン酸カリウム纖維、セッコウウイスカ、フォスフェートウイスカ、マグネシウムウイスカ、オキシ硫酸マグネシウム、マグネシウムパイロボレート、石綿、ワラスナイトなどが挙げられる。金属纖維としては、ステンレス鋼纖維、アルミニウム纖維、A1-Mg纖維、A1-Si纖維などが挙げられる。機械的強度が高い点でセラミックス膜、ステンレスベースのチタン膜などが使用可能である。

【0028】

キャスト法は、例えば、ポリマーをキャスト板などに流し込み、膜状に成形した後、架橋により該ポリマーに陽イオン交換基を導入することによって行われる。

【0029】

キャスト法において、膜素材であるポリマーとしては、例えば、ポリビニルアルコール（PVA）が挙げられる。膜の耐久性を向上させるために、耐熱性および耐酸化性が良好な含フッ素ポリマーも好適に用いられる。

【0030】

陽イオン交換膜は、片面を予め陰イオン交換膜で被膜してもよい。この被膜した面を電

気透析槽の原料投入室側に設置することによって、水性溶液中の陽イオン（金属イオン）が陽イオン性タンパク質よりも膜を通過しにくくなるため、精製効率が上昇し得る。さらに、被膜を交換することによって膜の劣化を防止し、電流効率が悪くなることを防ぐことができる。被膜は、陽イオン交換膜の表面に陰イオン交換膜を貼りつけること、あるいは陰イオン交換基を有する高分子物質を含有する溶液を塗布することによって行われ得る。

【0031】

微細孔膜は、目的の陽イオン性タンパク質を透過せず、かつ陽イオン（金属イオン）またはより小さい分子サイズのタンパク質を透過させる孔径を有する膜であれば、特に制限はない。このような微細孔膜としては、例えば、限外濾過膜および微細孔陽イオン交換膜が挙げられる。孔径は、通常、2 nm～200 nm、好ましくは2 nm～20 nmである。

【0032】

本発明に用いる電気透析装置は、上記のように、電気透析槽を備え、該電気透析槽が、該陽極側から順に、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室で構成され、該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、そして該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られている。電気透析槽の大きさは、処理量に応じて適宜設定すればよく、特に制限されない。電気透析槽の材質についても特に制限はない。通常、アクリル、ステンレスなどである。

【0033】

(電解質溶液)

電解質溶液は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの当業者が通常用いる電解質の水溶液であれば、特に制限はない。電解質溶液の濃度についても得に制限はない。好ましくは 1×10^{-3} mol/dm³～1 mol/dm³である。電解質の濃度が高いほど、電流効率はよくなるが、陽イオン性タンパク質精製物中に塩が含有されることになるため、注意を要する。電解質溶液のpHは、2～8が好ましい。

【0034】

(陰イオン交換体およびキレート化剤)

本発明の方法では、必要に応じて、陰イオン交換体またはキレート化剤を用いてよい。具体的には、原料投入室に、陰イオン交換体またはキレート化剤を添加する。陰イオン交換体を添加する場合、該陰イオン交換体に陰イオン性タンパク質および陰イオンが吸着されるため、膜への陰イオン性タンパク質の付着を防止でき、かつ陰イオンが交換されるため、電流効率を高く保持することができる。陰イオン交換体としては、当業者が通常用いる陰イオン交換性を有する物質であれば、特に制限はない。例えば、上記の陰イオン交換基が導入された陰イオン交換樹脂粒子、陰イオン交換セルロース、陰イオン交換セラミックなどが挙げられる。キレート化剤を添加する場合、該キレート化剤に陽イオン（金属イオン）が吸着されるため、陽イオン性タンパク質含有水溶液中の陽イオン（金属イオン）が減少し、陽イオン性タンパク質の膜透過効率が上昇する。キレート化剤としては、例えば、EDTAなどのポリアミノカルボン酸塩、クエン酸などのオキシカルボン酸類、それらの縮合リン酸塩、高分子キレート化剤、およびこれらの複合体などが挙げられる。

【0035】

(陽イオン性タンパク質の分離精製方法)

本発明の陽イオン性タンパク質の分離精製方法では、まず、電気透析槽の原料投入室に陽イオン性タンパク質含有水性溶液を、そして陽極室、濃縮室、および陰極室に電解質溶液を投入する。陽極室、濃縮室、および陰極室には、それぞれ同一の電解質溶液、あるいは異なる電解質溶液を投入し得る。陽イオン性タンパク質および電解質溶液の量は、電気透析槽の大きさに応じて設定すればよく、特に制限されない。このとき、上記の陰イオン交換体またはキレート化剤を投入してもよい。陰イオン交換体またはキレート化剤の投入量は、特に制限されない。通常、陽イオン性タンパク質水性溶液100質量部に対して1

質量部～5質量部の割合で投入され得る。

【0036】

次いで、電気透析装置に電流を負荷する。陽イオン性タンパク質を変性させずに分離精製する点で、負荷電流の電流密度は低いことが好ましく、例えば、 $0.1 \sim 50 \text{ mA/cm}^2$ である。その他の電気透析条件に特に制限はない。例えば、溶液温度は、通常 $4^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 、好ましくは室温に保持され得る。

【0037】

上記のように電気透析装置に電流を負荷することによって、原料投入室に存在する目的の陽イオン性タンパク質および陽イオン（金属イオン）が陽イオン交換膜を透過して濃縮室に移行する。一方、陰イオン性タンパク質および陰イオンが陰イオン交換膜を透過して濃縮室に移行する。濃縮室に移行された陽イオン性タンパク質と陽イオンのうち、分子サイズが小さい陽イオン性タンパク質と陽イオンとは微細孔膜を透過して陰極室に移行する。その結果、微細孔膜の孔径よりも分子サイズが大きい陽イオン性タンパク質が濃縮室中に濃縮される。このように、本発明の方法は、目的の陽イオン性タンパク質、好ましくはラクトフェリンを変性させることなく、電気透析を行う工程のみで簡便に分離精製することができる。

【0038】

このようにして得られた濃縮室中の陽イオン性タンパク質を含有する溶液は、さらに、当業者が通常用いる手段によって処理してもよい。例えば、陽イオン性タンパク質がラクトフェリンの場合、鉄を遊離させたアポラクトフェリンは、抗菌作用を發揮する。したがって、該溶液に含まれるラクトフェリンから鉄を遊離させるために、回収した溶液の pH を $1 \sim 3$ に調節することが好ましい。pH調整剤としては、例えば、塩酸、リン酸、フタル酸、グリシンなどが用いられる。あるいは、当業者が通常用いる手段によってさらに精製され得る。

【0039】

上記濃縮室中の溶液は、目的の陽イオン性タンパク質を高い割合で含有する。例えば、上記電気透析装置を用いてホエイからラクトフェリンを抽出する場合、上記濃縮室の溶液中に含まれる全タンパク質中のラクトフェリンの割合は非常に高く、全タンパク質の好ましくは 70 質量%以上、より好ましくは 95 質量%以上である。なお、ラクトフェリンは、抗ラクトフェリン抗体による免疫化学的方法、HPLC、SDS-PAGEなどを用いて測定される。上記濃縮室中の溶液に含まれる陽イオン性タンパク質は、その後、当業者が通常行う濃縮、乾燥、および粉末化などの処理を経て製剤化され得る。

【0040】

本発明の方法によって得られた陽イオン性タンパク質は、食品、医薬品、化粧品などの原料として種々の分野で使用することができる。

【実施例】

【0041】

（製造例 1：陽イオン交換膜の製造）

長纖維パルプ 20 g とクロロアセチルクロライド 200 g とを混合し、この混合液に、さらにトリエチルアミン 4 g を添加し、 80°C にて 12 時間還流した。次いで、この反応混合液（水酸基の一部がクロロアセチル化した長纖維パルプを含む）と濃硫酸とを容量比で 25 : 1 で混合し、還流しながら 30°C にて 12 時間保持し、アセチル基をスルホン化した。得られたスルホン基を有する長纖維パルプを回収し、エタノール／メタノール（容量比 1 : 1）混液、塩酸、および水で洗浄した。洗浄後、この長纖維パルプを纖維が十分絡み合うように叩解し、水中に分散させ、100 メッシュのナイロンで漉き、濾紙状に成形した。得られたスルホン基を導入した濾紙状物を不織布の間に挟み、ローラーで加圧した後、 60°C のオーブンにて自由水を除去して陽イオン交換膜（濾紙膜）を得た。この陽イオン交換膜は、孔径が $1 \mu\text{m} \sim 5 \mu\text{m}$ 、厚みが 0.3 mm、および交換容量が 0.28 meq/g 乾燥膜であった。なお、孔径は、種々の粒径を有する粒子について、得られた濾紙膜を透過し得た粒子を光学顕微鏡で観察したときの最大粒子径である。

【0042】

(製造例2：陽イオン交換膜の製造)

50mLのイオン交換水に、3.5gのポリビニルアルコール(PVA)および0.1.9gの2-アミノピリジン(2-AP)を添加して90℃にて90分間加熱攪拌してPVAを溶解させた。次いで、このPVA溶液を十分に冷却し、キャスト板に流し込み、ホットプレート上で50℃にて約6時間乾燥させた。得られたPVA膜を2Nの塩化ナトリウム水溶液に浸漬させ、25℃にて24時間保持した。これとは別に、0.8mLのグルタルアルデヒド(GA)および1.73mLの11.6Nの塩酸水溶液を、2Nの塩化ナトリウム水溶液で全体容量が200mLとなるようにGA溶液を調製した。このGA溶液に、上述の浸漬後のPVA膜を移して浸漬させ、25℃にて24時間保持した。さらにイオン交換水に浸漬させ、イオン交換水を毎日交換しながら5日間以上保持した。このようにして得られた陽イオン交換膜は、厚みが0.4～0.8mm、および交換容量が0.5meq/g湿潤膜～2meq/g湿潤膜であった。

【0043】

(実施例1)

電気透析装置を以下のようにして準備した。まず、アクリル樹脂製の電気透析装置を作製し、その電気透析槽内を陽極側から順に、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室で構成されるように仕切った。すなわち、陽極室と原料投入室とを陰イオン交換膜(AM-1、株式会社トクヤマ)で仕切り、原料投入室と濃縮室とを上記製造例1で得た陽イオン交換膜で仕切り、および濃縮室と陰極室とを微細孔陽イオン交換膜(CM-1、株式会社トクヤマ)で仕切った。

【0044】

低温殺菌牛乳(40g)に、 $100\mu\text{g}/\text{g}$ となるようにウシラクトフェリン(シグマ社)を溶解した。このラクトフェリン含有牛乳を、上記電気透析装置の原料投入室に投入し、一方、陽極室、濃縮室、および陰極室に、pH7の0.1M NaCl水溶液を投入した。電気透析装置に $1\text{mA}/\text{cm}^2$ の電流を20分間負荷させた。電流負荷後、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室中の溶液を回収し、それぞれ陽極室溶液、原料投入室溶液、濃縮室溶液、および陰極室溶液とした。

【0045】

上記の各室の溶液中のラクトフェリンを非還元条件下でSDS-PAGEにより確認した。得られた各室の溶液を $10\mu\text{L}$ ずつ、それぞれ2つのLaneに注入した(Lane 3および4：陰極室溶液、Lane 5および6：濃縮室溶液、Lane 7および8：原料投入室溶液、Lane 9および10：陽極室溶液)。なお、比較として、ウシラクトフェリンを $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有する水溶液(Lane 1および2)および原料である低温殺菌牛乳(Lane 11および12)をそれぞれ、 $5\mu\text{L}$ (上記溶液の1/2量)注入した。結果を図2に示す。

【0046】

図2に示すように、原料である低温殺菌牛乳では、ラクトフェリンのバンドおよび他のタンパク質のバンドが検出されたのにに対して、濃縮室の溶液では、ラクトフェリンのバンドのみが検出された。また、陽極室の溶液および陰極室の溶液には、ラクトフェリンのバンドは、検出されなかった。これらのこととは、上記の電気透析装置を用いることによって、陽イオン性タンパク質を分離精製することができるることを示す。

【0047】

さらに、得られた濃縮室溶液10mLに、5mMのNTA(ニトリロトリアセテート)を含有する溶液および5mMのFeCl₃を含有する溶液をそれぞれ $50\mu\text{L}$ ずつ加えて混合した。その結果、ラクトフェリンの鉄結合性の指標である465nmで吸収が段階的に増加することが明らかとなった。このことは、濃縮室溶液中のラクトフェリンが正常に鉄結合能力を有することを示す。したがって、ラクトフェリンが変性せずに抽出されていると考えられる。

【0048】

(実施例2)

低温殺菌牛乳の代わりに、チーズホエイ（四葉乳業）を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、電気透析装置に電流を負荷させた。実施例1と同様にして、得られた各室の溶液中のラクトフェリンをSDS-PAGEにて確認したところ、実施例1と同様に、原料であるチーズホエイでは、ラクトフェリンのバンドおよびその他のタンパク質のバンドが検出されたのに対して、濃縮室の溶液では、ラクトフェリンのバンドのみが検出された。また、陽極室の溶液および陰極室の溶液には、ラクトフェリンのバンドは、検出されなかった。

【0049】

(比較例1)

実施例1で用いた陽イオン交換膜の代わりに、石油系高分子膜（CM-1、株式会社トクヤマ）を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、電気透析装置にラクトフェリン含有牛乳を投入し、電流を負荷させた。実施例1と同様にして、得られた各室の溶液中のラクトフェリンをSDS-PAGEにて確認したところ、原料投入室溶液のみでラクトフェリンのバンドが検出された。このことは、ラクトフェリンが、石油系高分子膜に透過しないことを示す。

【0050】

(比較例2)

実施例1で用いた陽イオン交換膜の代わりに、石油系高分子膜（CM-2、株式会社トクヤマ）を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、電気透析装置にラクトフェリン含有牛乳を投入し、電流を負荷させた。実施例1と同様にして、得られた各室の溶液中のラクトフェリンをSDS-PAGEにて確認したところ、比較例1と同様、原料投入室溶液のみでラクトフェリンのバンドが検出された。

【産業上の利用可能性】

【0051】

本発明の方法によれば、陽イオン性タンパク質を、変性させることなく、電気透析する工程のみで簡便に分離精製することができる。本発明によって得られた陽イオン性タンパク質、好ましくはラクトフェリンは、食品、医薬品、化粧品などの原料としての使用に好適である。

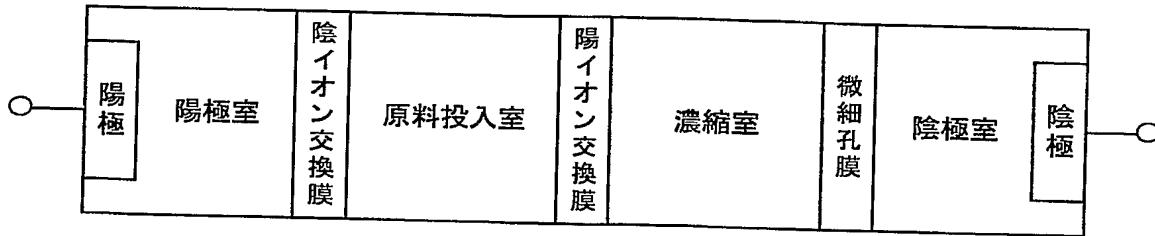
【図面の簡単な説明】

【0052】

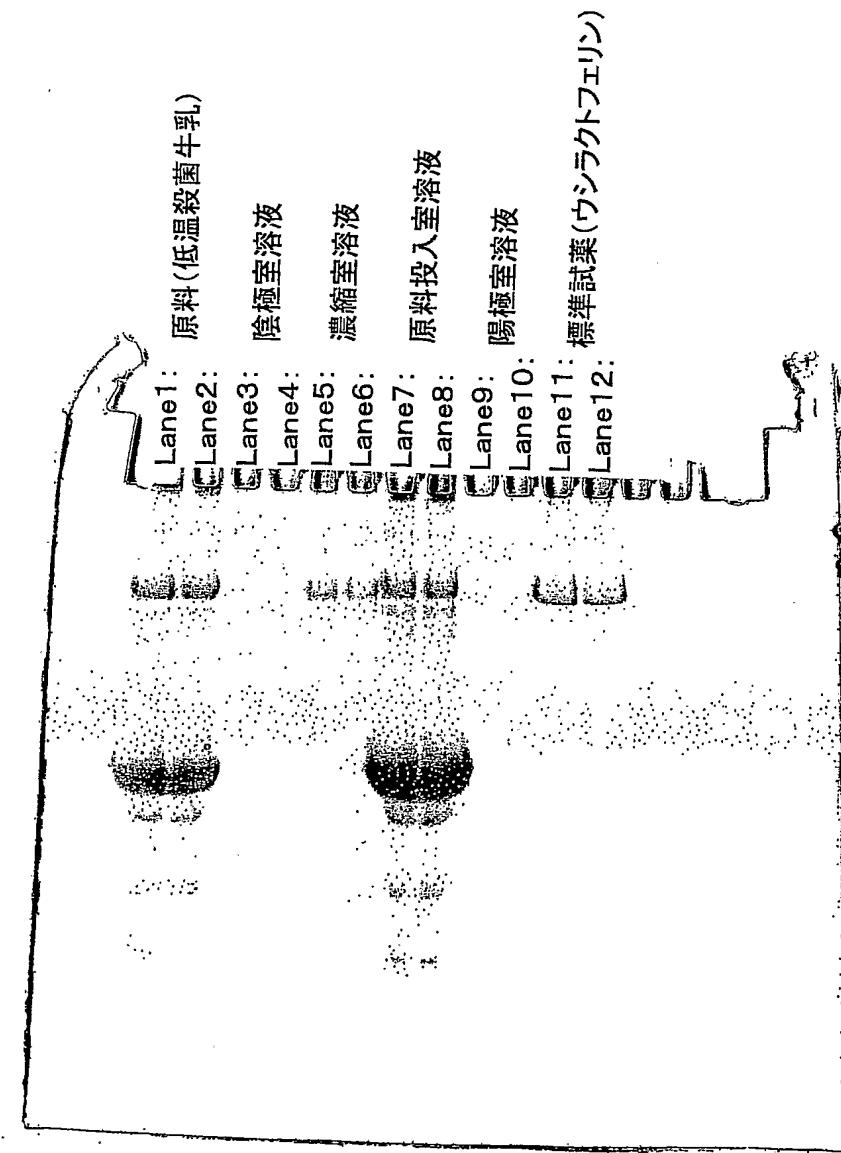
【図1】本発明に用いられる電気透析装置における電気透析槽の模式図である。

【図2】各溶液についてのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の写真である。

【書類名】図面
【図1】



【図2】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 陽イオン性タンパク質を変性させない簡便な分離精製方法を提供すること。

【解決手段】 本発明の陽イオン性タンパク質を分離精製する方法は、電気透析装置を用いて行われる。ここで用いる電気透析装置は、陽極と陰極とを有する電気透析槽を備え、そして該電気透析槽が、該陽極側から順に、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室を備え、該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、そして該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られている。本発明の方法は、この電気透析装置において、（1）該原料投入室に陽イオン性タンパク質含有水性溶液を投入し、該陽極室、該濃縮室、および該陰極室に電解質溶液を投入する工程、（2）該電気透析装置に電流を負荷する工程、および（3）該濃縮室から陽イオン性タンパク質を含有する溶液を回収する工程を包含する。

【選択図】 図1

特願 2004-026689

出願人履歴情報

識別番号 [599045903]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1999年 3月29日

新規登録

福岡県久留米市旭町67番地
学校法人 久留米大学